

**NACHWEIS VON SPALTPRODUKTEN DER
IMMUNGLOBULINE BEI
CHRONISCHEN EITERUNGEN
IM MENSCHLICHEN MITTELOHR**

Gerd Tappermann

1976

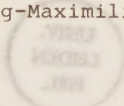


Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der HNO-Universitätsklinik München
Direktor: Professor Dr. med. H. H. Naumann
Biochem. Labor: Leiter PD Dr. K. Hochstraßer

NACHWEIS VON SPALTPRODUKTEN DER IMMUNGLOBULINE
BEI CHRONISCHEN EITERUNGEN IM MENSCHLICHEN MITTELOHR

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Gerd Tappermann
aus München

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. H. Naumann

2. Berichterstatter: Priv.-Dozent Dr. med. E. Kastenbauer

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 6. 7. 1976



Herrn Professor Dr. H. H. Naumann danke ich
für die guten Arbeitsbedingungen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Privat-Dozent
Dr. E. Kastenbauer für die Überlassung des
Themas und sein Interesse an der Arbeit.

Herrn Privat-Dozent Dr. K. Hochstraßer danke
ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplat-
zes in seinem Labor und für seine wertvollen
Ratschläge.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AG: Antigen

AK: Antikörper

α_1 -AT: α_1 -Antitrypsin

I.E.: Internationale Immunglobulin-Einheiten

Pat. Sekret: Patientensekret

Standard HS: Standard Human Serum

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A EINLEITUNG	1 - 3
B THEORETISCHER TEIL	4 - 8
I. Charakteristik der Immunglobuline	4
II. Aufbau der Immunglobuline	5 - 6
III. Biologische Eigenschaften der drei Immunglobulin-Hauptklassen	7
C ERGEBNISSE	8 - 31
I. Immunelektrophoretischer Nachweis von Immunglobulin-Bruchstücken und Abbaupro- dukten	8 - 10
1. Patientenauswahl	8
2. Beschicken der Immunelektrophoreseträger	8 - 9
3. Ergebnisse	9 - 10
II. Fraktionierung von 50. Pat.-Sekreten mit- tels der Molekularsäule mit Sephadex ^(R) -G 200	10 - 11
1. Patientenauswahl	10
2. Beschickung der Säule	10 - 11
3. Ergebnisse	11
III. Proteolytische Aktivität in den einzelnen Fraktionen der 50 Pat.-Sekrete (Azokasein- Test)	12 - 15
1. These	12
2. Versuchsablauf	12
3. Ergebnisse	12 - 15

	Seite
IV. Auftrennung nach Molekulargewichten	16
1. Eichkurve	16
2. Ergebnisse	16
V. Nachweis von Immunglobulinen und Bruchstücken in den Fraktionen	16 - 31
1. Qualitativer Nachweis mit dem Ouchterlony-Test	16 - 17
a) Vorbehandlung der Fraktionslösungen	16
b) Durchführung des Ouchterlony-Testes	16 - 17
c) Ergebnisse	17
2. Quantitative Bestimmung der Immunglobuline mit dem Mancini-Test	17 - 18
a) Durchführung des Testes	17 - 18
b) Ergebnisse	18 - 28
3. Immunelektrophoretischer Nachweis von Bruchstücken	29 - 31
a) Immunelektrophorese der gesamten 50 Pat.-Sekrete, die fraktioniert wurden	29
b) Nachweis der Bruchstücke und Einordnung nach Molekulargewicht	30 - 31
D DISKUSSION	32 - 33
E EXPERIMENTELLER TEIL	34 - 52
I. Patientenauswahl	34
II. Sekretaufbereitung	34
1. Sekretentnahme	
2. Weitere Zubereitung	
3. Aufbewahrung	

	Seite
III. Zweidimensionale Doppel-Immundiffusion nach Ouchterlony	35 - 37
1. Material	35
2. Methode	35 - 37
a) Herstellen der Stammlösung	35
b) Herstellen der Agargel-Mikroplatten	35 - 36
c) Aufbewahrung	36
d) Beschicken der Träger	36
e) Bildung der Immunpraecipitate	36
f) Fixierung des Praecipitatbildes	36 - 37
g) Auswertung	37
IV. Immunelektrophorese	37 - 41
1. Prinzip	37 - 38
2. Reagentien und Geräte	38
3. Methode	38 - 41
a) Herstellung der Agargel-Microplatten	38 - 39
b) Aufbewahrung	39
c) Beschicken	39 - 40
d) Elektrophorese	40
e) Einfüllen des Antiserums	40
f) Fixierung des Praecipitationsbildes	40 - 41
g) Auswertung	41
V. Einfache radiale Immundiffusion nach Mancini	41 - 47
1. Prinzip	41
2. Reagentien und Geräte	41 - 42
3. Methode	42 - 47
a) Beschicken	42
b) Praecipitatbildung	42
c) Aufstellen der Bezugskurven	43 - 46
d) Internationale Standardisierung quantitativer Immunglobulinbestimmungen	47

	Seite
VI. Gelfiltration mit Sephadex ^(R) -G-200 (Molekulargewichtsbestimmung)	47 - 51
1. Prinzip	47 - 48
2. Reagentien und Geräte	48
3. Methode	49 - 51
a) Packen der Säule	49
b) Äquilibrieren der Säule	49
c) Auftragen der Testsubstanzen	49
d) Testlauf	50
e) Erstellen der Eichkurve	50 - 51
f) Analysen-Fraktionierung	51
g) Auswertung	51
VII. Proteolytische Aktivitätsbestimmung (Azokasein-Test)	51 - 52
1. Prinzip	51
2. Material	52
3. Methode	52
VIII. Bakteriologische Untersuchungen	52
F. ZUSAMMENFASSUNG	53
G. LITERATURVERZEICHNIS	54 - 58
LEBENS LAUF	59

A. EINLEITUNG

Bei chronischen Entzündungen und Eiterungen im menschlichen Mittelohr ist die Schleimhaut der Paukenhöhle und der retrotympanalen Räume mit einer pathogenen Keimflora besiedelt.

Die Besiedelung erfolgt entweder durch die Tuba auditiva oder infolge eines Trommelfelldefektes über den äußeren Gehörgang.

In den hier untersuchten Fällen handelt es sich vor allem um Patienten mit der Besiedelung von *Pseudomonas aeruginosa* und mit Keimen der *Proteus Providentia* Gruppe, wie durch bakteriologische Untersuchungen der Ohrsekrete nachgewiesen werden konnte.

In der Regel muß einer Entzündung eine Schädigung des Gewebes (Trommelfell) oder zumindest eine Herabsetzung der Abwehrlage des Organismus vorausgehen, da dem Organismus im Normalfall zur Erhaltung des biologischen Gleichgewichtes sehr wirksame zelluläre wie auch humorale Immunmechanismen zur Verfügung stehen.

Im Rahmen der hier aufgestellten Untersuchungen wurden innerhalb der humoralen Immunabwehr vor allem die Antikörper der Immunglobulin-Klassen Ig G, Ig A und Ig M einer genauen Untersuchung unterzogen.

Bei allen untersuchten Sekretproben aus chronisch entzündeten Mittelohren konnte mit Hilfe des Azokaseintestes eine hohe proteolytische Aktivität festgestellt werden.

Die hierfür verantwortlichen und bisher bekannten Proteasen sind von verschiedener Herkunft:

a) Gewebsproteasen

Hier verdient unter anderen die von Abramson 1969 im Plattenepithel des Cholesteatoms und im Granulationsgewebe nachgewiesene Gewebskollagenase besondere Beachtung.

b) Leukozytäre Proteasen

Diese entstehen durch den Zerfall aus Leukozyten, die bei einer Entzündung bekanntlich vermehrt auftreten.

c) Bakterielle Proteasen

Besonders aktive Proteasen scheinen die des *Pseudomonas aeruginosa* zu sein, die offenbar in großer Menge produziert, von den physiologisch im Serum vorkommenden Inhibitoren unbeeinflusst, nur durch das Alpha-2-Makroglobulin hemmbar sind, das normalerweise im Ohrsekret wegen seines hohen Molekulargewichtes nur in geringer Menge und dann in inaktiver Form vorkommt.

Dem Organismus stehen im physiologischen Normalfall als Schutzmechanismus gegen freigesetzte Proteasen eine Reihe von natürlichen Proteasen-Inhibitoren im Serum zur Verfügung, z. B.:

Alpha-1-Antitrypsin (α_1 -AT)

Alpha-1-Chymotrypsin

Alpha-2-Makroglobulin

Intertrypsin-Inhibitor u. a.

Alpha₁-AT ist ein Alpha₁-Globulin des Serums mit einem Molekulargewicht (MG) von 45 000 und gilt als wichtigster Trypsin-Inhibitor. Es vermag Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Kollagenase und, - was hier von besonderer Bedeutung ist - Proteasen aus Leukozyten und bestimmten Bakterien zu hemmen. Die Hemmung wird durch Komplexbildung bewirkt (1).

Allerdings kann Alpha₁-AT keine Proteasen aus *Pseudomonas aeruginosa* hemmen, sondern wird sogar durch diese abgebaut (2).

Zur Hemmung der Pyoprotease ist nur Alpha-2-Makroglobulin befähigt, ein Inhibitor mit sehr breitem Hemmspektrum, welcher jedoch auf Grund seines großen Molekulargewichtes (850 000) in Schleimhautsekreten nur in sehr geringer Konzentration auftritt (3) und daher

bei der konservativen Therapie von Mittelohreiterungen eine untergeordnete Rolle spielt.

Ob in der Schleimhaut des Mittelohres mit dem Vorkommen eines speziellen, niedermolekularen Proteasen-Inhibitors - ähnlich dem durch Hochstraßer und Mitarbeiter (4) beschriebenen Inhibitor im Nasensekret, welcher die katalytische Wirkung von Trypsin, Chymotrypsin, Pronase und einigen leukozytären Proteasen hemmt (5) - zu rechnen ist, kann noch nicht mit endgültiger Sicherheit gesagt werden.

Unveröffentlichte Arbeiten von R. Reichert weisen allerdings in diese Richtung.

Ein Abfallen des Proteasen-Inhibitorspiegels bei chronisch entzündlichen Veränderungen im Mittelohr, bedingt durch ein Ansteigen der Gewebs- und Leukozytenproteasen und der freigesetzten Proteasen aus pathogenen Keimen sind als Ursache für das Auftreten der Immunglobuline anzusehen.

Der Nachweis des Vorhandenseins dieser Abbauprodukte und Fragmente der genannten Immunglobulin-Klassen stellt das Untersuchungsthema dieser Arbeit dar.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Charakteristik der Immunglobuline

Tiselius * teilte 1937 die Plasmaproteine auf Grund ihrer Beweglichkeit im elektrischen Feld in vier Hauptgruppen ein:

- Albumine
- α_1 -Globuline
- beta-Globuline
- gamma-Globuline

Bald darauf stellte man fest, daß menschliche Antikörper der Gruppe der gamma-Globuline zuzurechnen sind.

Diese Gruppe umfaßt alle antikörperhaltigen Proteine, die infolge einer Inkorporation von körperfremden Stoffen - welche als Antigene und Immunogene bezeichnet werden - als spezifische Immunantwort gebildet werden.

Die Antwort ist insofern spezifisch, als sie auf ein und dasselbe Antigen bzw. auf mit ihm fast identische Substanzen gerichtet ist.

Die Spezifität der Immunantwort resultiert aus der Antigenspezifität, d. h. aus verhältnismäßig kleinen, definierten Oberflächen - Bezirken des Antigenmoleküls, die als antigene Determinanten oder Hapten-Gruppen bezeichnet werden (6).

Charakteristisch für die Immunglobuline ist also die Bindung ihrer komplementären Antigene, sowie die Induktion der Komplementfixation, wodurch eine Phagozytose und Abtötung von Mikroorganismen wesentlich gefördert wird.

* Professor Tiselius, Arne (Stockholm) 1948 Nobelpreis für Chemie

II. Aufbau der Immunglobuline

R. R. Porter und Mitarbeiter (7) befaßten sich mit der Strukturanalyse der Immunglobuline, wobei sie auf Arbeiten von G. M. Edelman und M. D. Poulik aufbauten.

Auf Grund dieser Arbeiten konnte Porter ein Strukturschema für Kaninchen-Ig G aufstellen, dessen allgemeine Gültigkeit nicht nur für Kaninchen-Ig G, sondern auch für die Immunglobuline des Menschen und einer Reihe von anderen Spezies bestätigt wurde.

Die wesentlichen Merkmale dieser Struktur können so zusammengefaßt werden:

Die Immunglobuline sind aus Paaren von Polypeptid-Ketten zusammengesetzt, den kleineren oder leichten (L-) Ketten, die allen Immunglobulinen gemeinsam sind, und den größeren oder schweren Ketten (H-Ketten), die entsprechend der jeweiligen Immunglobulinklasse variieren.

Jede L- und jede H-Kette hat einen konstanten Teil, dessen Aminosäuresequenz von einem Immunglobulin zum anderen gleich ist und einen variablen Teil, dessen Aminosäuren an vielen Positionen entlang der Kette sich bei unterschiedlichen Molekülen unterscheiden.

Die Antikörperspezifität wird durch die Anordnung der Aminosäuren im variablen Teil bedingt, der für jeden einzelnen Antikörper einmalig ist (8).

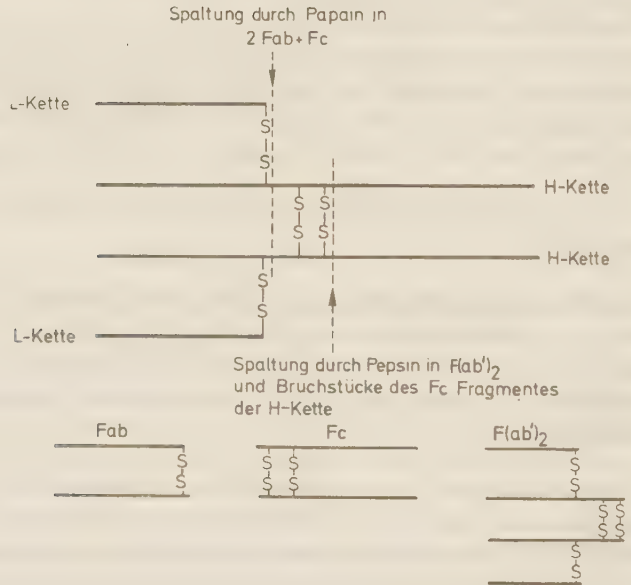
Proteolytische Enzyme wie Pepsin oder Papain spalten die Immunglobuline an, für jedes Enzym spezifischen Spaltungsorten in größere Fragmente, die jeweils einen Teil der biologischen Eigenschaften des Ausgangsmaterials beibehalten. Dies wurde im immunoelektrophoretischen Bild gut von M. D. Poulik (9) dargestellt.

Durch die Analyse dieser Fragmente und die Interpretation ihrer Bedeutung legte Porter 1959 die Grundlage für seine späteren Arbeiten über die Struktur der Immunglobuline (10).

Nachfolgendes Schema gibt die Struktur des Ig G-Globulins nach R. R. Porter wieder, woraus die Spaltungsorte durch Papain und

Pepsin, sowie die dabei entstehenden Fragmente ersichtlich werden.

Abb. Nr. 1



Zu Abb. Nr. 1

Schematische Struktur des IgG nach R. R. Porter, analog zu Humphrey/White (11). Die Zahl der, die H-Ketten verbindenden Disulfidbrücken ist bei den Unterklassen des menschlichen Ig G verschieden; sie liegt zwischen eins und fünf.

Wichtig für unsere Untersuchungsergebnisse scheint noch die Feststellung, daß die Antikörper-Bindungsstellen des Ig G an den Enden von zwei "Armen" liegen (Fab).

Diese beiden Arme scheinen flexibel miteinander verbunden zu sein, so daß die Bindungsstellen ihren Abstand zueinander variieren können. Diese Eigenschaft bleibt auch dann noch erhalten, wenn das Fc-Fragment durch Pepsinabbau entfernt wird.

III. Biologische Eigenschaften der drei Immunglobulin-Hauptklassen

Bezüglich detaillierter Tabellen und Angaben über Molekulargewichte und andere Eigenschaften sei auf "Kabat and Meyer's experimental immunochemistry" (12) verwiesen. Neben den hier in Tabelle Nr. 1 aufgeführten biologischen Eigenschaften sei noch erwähnt, daß ein Austausch von Ig G zwischen Blut und extravaskulärer Flüssigkeit leicht stattfinden kann.

Ig A hat die Tendenz, seine 7-S-Moleküle zu Verbindungen mit höheren Sedimentationskoeffizienten zu aggregieren.

Ig M schließlich wird bei "Normalpersonen" vorwiegend im Blutstrom angetroffen. Ohne Vorliegen einer lokalen Entzündung und damit einer erhöhten Permeabilität der Kapillärwände kann es infolge seines hohen Molekulargewichtes nur bedingt aus der Blutbahn austreten.

Ungeachtet seines hohen MG's besitzt es dennoch eine ähnliche Grundstruktur wie Ig G und Ig A. Anstelle von deren zwei H- und zwei L-Ketten enthält Ig M zehn H- und wahrscheinlich auch zehn L-Ketten, wodurch sich ein flaches, zylindrisches Areal bilden läßt, aus welchem fünf "Arme" radial herausragen.

Die Struktur von Ig M läßt auf eine Schutzwirkung vor allem gegen Mikroben und andere große Antigene schließen, welche auf ihrer Oberfläche ein Antigenmosaik von sich wiederholenden Determinanten besitzen.

Abb. Nr. 2

Schema der vermuteten Struktur von Ig M nach Humphrey/White (13).



Die Schemazeichnung gibt die mögliche Anordnung der H- und L-Ketten im Ig M wieder. Die genaue Lage der Disulfidbrücken ist unbekannt.

C. ERGEBNISSE

I. Immunelektrophoretischer Nachweis von Immunglobulin-Bruchstücken und Abbauprodukten

1. Patientenauswahl

Zur Untersuchung herangezogen wurden Patienten mit starkem praeoperativem Sekretfluß auf Grund von chronischen Mittelohreiterungen bei:

- Cholesteatomen,
- Radikalhöhlen,
- Schleimhauteiterungen,

deren bakteriologische Untersuchungsergebnisse der Sekrete eine starke Keimbesiedelung mit Keimen der Proteus-Providentia-Gruppe und/oder mit Pseudomonas aeruginosa aufwiesen.

Als erste Test-Sekrete wurden verwendet:

- 6 Pat. Sekrete praeoperativ (ohne Vorbehandlung),
- 6 Pat. Sekrete postoperativ (nach ca. einem Monat).

2. Beschicken der Immunelektrophoreseträger

Die 12 Pat. Sekrete wurden auf Bruchstücke aller drei Hauptimmunglobulin-Klassen untersucht.

Zur Kontrolle des Praecipitatbildes lief auf jedem Träger in der zweiten Auftragstelle Human-Standard-Serum (Standard-HS) mit, das die vollständige Praecipitationslinie der jeweiligen Immunglobulin-Klasse wiedergab.

Um auch ein nur geringgradiges Abweichen des Praecipitationsbildes von dem der jeweilig intakten Antikörper (AK) noch deutlich zu machen, wurde die Testreihe wiederholt, wobei in die Auftragstelle

der Pat. Sekrete zusätzlich noch Standard-HS gegeben wurde.

3. Ergebnisse

- Die Untersuchungen der 12 Pat. Sekrete mit Anti Ig A-Serum zeigten im Praecipitationsbild keine Antikörper-Bruchstücke.
- Die Untersuchungen der 12 Pat. Sekrete mit Anti Ig M-Serum zeigten im Praecipitationsbild ebenfalls keine Antikörper-Bruchstücke.
- jedoch:

Alle Immunelektrophoresen, die mit den Pat.Sekreten der 6 nicht vorbehandelten Patienten gegen Anti Ig G-Serum hergestellt wurden, zeigten eindeutig das Auftreten von Antikörper-Bruchstücken.

Diese machten sich im elektrophoretischen Praecipitationsbild durch das Erscheinen von Doppellinien bzw. gespaltenen Linien (Sporns) deutlich (Abb. Nr. 3).

Diese Doppellinien können wiederum nur in Erscheinung treten, wenn sich in den Pat. Sekreten Bruchstücke von Immunglobulinen befinden, die sich vom intakten Immunglobulin durch die Anzahl der elektrischen Ladungen und dadurch auch durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld unterscheiden. Zudem müssen es Bruchstücke sein, deren Antigenität durch das Verbleiben von zwei oder mehr Antikörper-Bindungsstellen am Molekül gesichert ist.

Damit war der Nachweis geführt, daß zumindest bei den Immunglobulinen der Klasse Ig G Fragmente auftreten, die sich im immunoelektrophoretischen Bild nachweisen lassen.

Eine genauere Untersuchung dieser Antikörper-Bruchstücke konnte nun gezielt erfolgen.

Abb. Nr. 3

Auftreten von Doppellinien im Elektrophoresebild als Hinweis für das Vorhandensein von Immunglobulin-Bruchstücken im Pat. Sekret.



II. Fraktionierung von 50 Pat. Sekreten an der Molekularsäule mit Sephadex^(R)* - G 200

1. Patientenauswahl

Zur Untersuchung kamen Sekretproben von 50 Patienten mit starker Sekretbildung im chronisch entzündeten Mittelohr. Sämtliche Sekrete zeigten bakterielle Keimbesiedelung der bereits beschriebenen Art (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus Providentia*-Gruppe).

2. Beschicken der Säule

Nach dem Abzentrifugieren der Sedimente und nach dem Einengen der aufgeschwemmten Sekrete wurden 6,5 ml der aufbereiteten Lösung der

* Sephadex^(R) ist ein geschl. Warenzeichen der Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala)

50 Pat. Sekrete auf die Trennsäule aufgetragen und die Fraktionierung mit jeweils 50 Tropfen pro Fraktionsglas (= 3,1 ml pro Glas) vorgenommen.

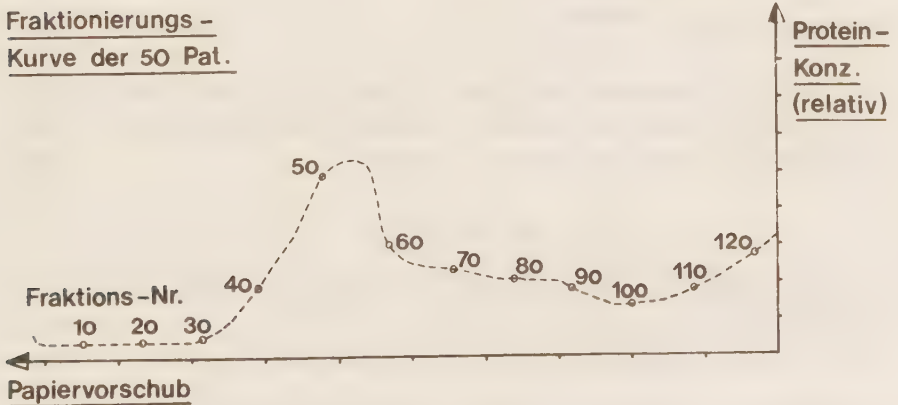
3. Ergebnisse

Als Ergebnis lieferte der angeschlossene Schreiber eine Verteilungskurve der, in der aufgetragenen Lösung enthaltenen Proteine, aufgetrennt nach ihrer Molekulargröße (Abb. Nr. 4).

Das Ansteigen der Kurve ab Fraktionszahl 110 konnte als Artefakt identifiziert werden und findet daher in den weiteren Betrachtungen keine Bedeutung.

Abb. Nr. 4

Fraktionierungskurve der 50 Pat. Sekrete.



III. Proteolytische Aktivität in den einzelnen Fraktionen der 50 Pat. Sekrete (Azokaseintest (37))

1. These

Wird das inhibitorische System, welches die Inhibierung der bakteriellen und leukozytären sowie der Gewebsproteasen bedingt, durch einen Überschuß an Proteasen überspielt, so müßte in den Fraktionen der Pat. Sekrete starke proteolytische Aktivität nachweisbar sein.

2. Versuchsablauf

Beginnend bei der Fraktion Nr. 52 wurde jedem dritten Glas 0,5 ml der fraktionierten Sekret-Lösung entnommen und die proteolytische Aktivität mit Hilfe des Azokasein-Testes photometrisch als absolute Extinktionsdifferenz zum Nullwert in die Fraktionierungskurve eingetragen (Abb. Nr. 5).

3. Ergebnisse

Es konnte einwandfrei eine hohe proteolytische Aktivität in verschiedenen Fraktionen gemessen werden. Die maximale absolute Extinktionsdifferenz zum Nullwert betrug:

$$\Delta E = 144 \text{ bei } 366 \text{ nm.}$$

Diese proteolytische Aktivität verteilte sich auf Fraktionen, zu denen ein Molekulargewicht zwischen 120 000 bis 150 000 in Relation gesetzt werden kann (Abb. Nr. 5 und Abb. Nr. 7).

Hochgesand (14) fand bei seinen Untersuchungen über entzündliche Ohrsekrete ebenfalls hohe proteolytische Aktivitäten. Er differenzierte zusätzlich nach verschiedenen Krankheitsbildern, mit folgendem Ergebnis:

- | | |
|------------------------------------|------------------|
| - bei Cholesteatomen | $\Delta E = 520$ |
| - bei chron. Schleimhauteiterungen | $\Delta E = 325$ |
| - bei akuter otitis media | $\Delta E = 359$ |

Diese Werte gelten jeweils bezogen auf 1 mg Trockengewicht der lyophilisierten Ohrsekrete.

Abb. Nr. 5

Proteolytische Aktivität in den Fraktionen der 50 Pat. Sekrete.

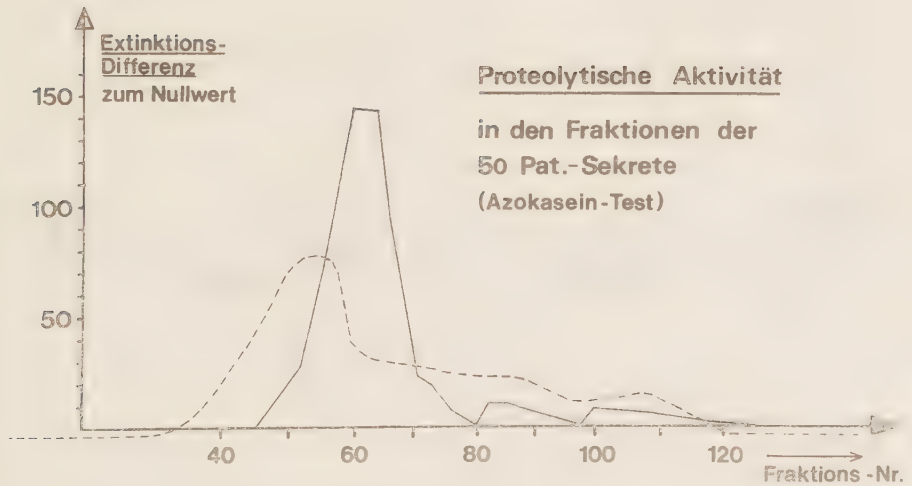


Abb. Nr. 6

Eichkurve zur Berechnung des Molekulargewichtes.

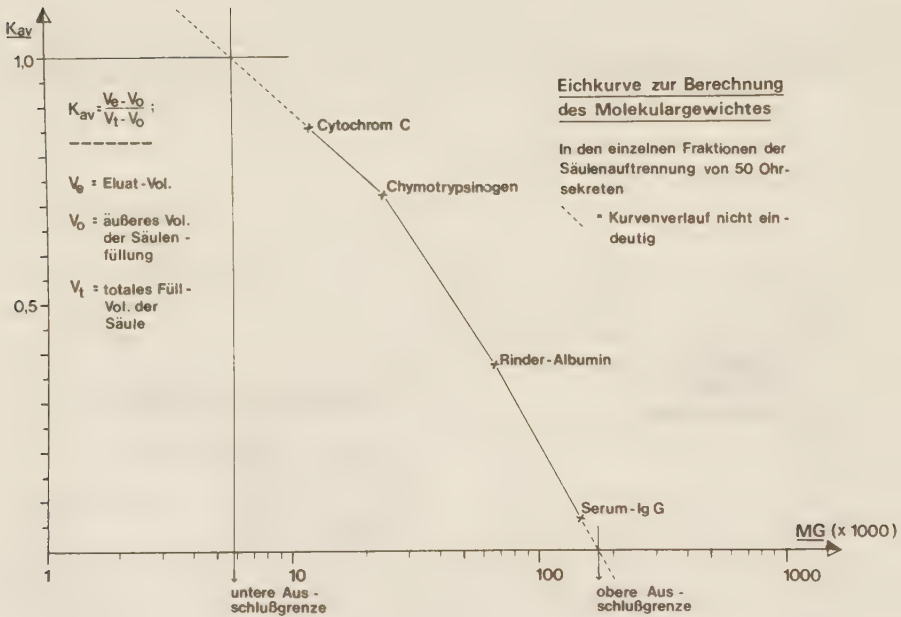
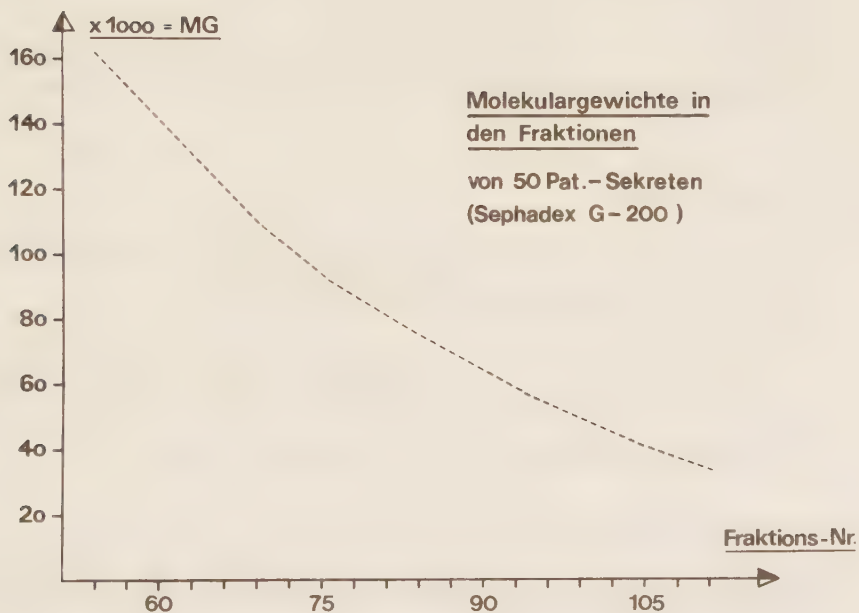


Abb. Nr. 7

Molekulargewichte in den einzelnen Fraktionen.



IV. Auftrennung nach Molekulargewichten

1. Eichkurve

Aus den, durch einen Testlauf mit verschiedenen Test-Substanzen (Cytochrom C, Chymotrypsinogen, Rinderalbumin, Serum-Ig G und Dextranblau) erhaltenen Werten ließen sich die K_{av} -Werte für diese, im MG definierten Substanzen berechnen.

Diese Werte, in Relation gesetzt zum logarithmisch aufgetragenen MG, eignen sich für die Erstellung einer Eichkurve (Abb. Nr. 6).

2. Ergebnisse

Für die einzelnen Fraktionen wurde das jeweilige MG berechnet und eine eigene Graphik davon angefertigt (Abb. Nr. 7).

V. Nachweis von Immunglobulinen und Bruchstücken in den Fraktionen

1. Qualitativer Nachweis mit dem Ouchterlony-Test

a) Vorbehandlung der Fraktions-Lösungen

Für diese und für die folgenden Untersuchungen wurden die einzelnen Fraktionen restlos eingeengt.

Anschließend wurde die Substanz wieder mit 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und in diesem Zustand für die weiteren Untersuchungen verwendet.

b) Durchführung des Ouchterlony-Testes

Ab Fraktionsglas Nr. 30 wurde jedes dritte Glas bis einschließlich Glas Nr. 116 auf das Vorhandensein von Immunglobulinen bzw. deren Bruchstücke untersucht. Hierzu wurden auf die Träger mit Anti Ig G in der zentralen Auftragstelle je Probe 10 µl der Fraktionslösung aufgetragen.

Die Träger mit Anti Ig A und Anti Ig M-Serum in der zentralen Auf-
tragstelle wurden mit jeweils 30 μ l der gemäß a) aufbereiteten Frak-
tionslösung beschickt.

c) Ergebnisse

Ig G: Glas Nr.: 30 - 45 neg.
 48 - 63 pos.
 66 - 81 pos.
 84 - 94 pos. (96, 99 neg.)
 102 - 110 pos. (ab 113 neg.)

Ig A: Glas Nr.: 30 - 45 neg.
 48 - 63 pos.
 66 - 81 pos.
 84 pos.
 87 - 116 neg.

Ig M: Glas Nr.: 30 - 45 neg.
 48 - 63 pos.
 66 - 81 neg.
 84 - 99 neg.
 102 - 116 neg.

Bedeutsam bei diesen Ergebnissen erscheint die Tatsache, daß in
der Fraktion Nr. 96 bis Nr. 99 keine Praecipitations-Reaktion auf-
tritt, bei Glas Nr. 102 bis 110 jedoch eine positive Reaktion ge-
gen Bruchstücke von Ig G zu verzeichnen ist.

2. Quantitative Bestimmung der Immunglobuline mit dem Mancini-
Test (27)

a) Durchführung des Testes

Für die Ig G Konzentrationsbestimmung in den einzelnen Fraktionen
werden je 5 μ l Pat.-Sekret-Lösung verwendet. Für Ig A und Ig M wur-
den jeweils 20 μ l dieses Pat. Sekretes verwendet.

Die ersten drei Auftragstellen jeder Platte wurden in aufsteigender Konzentration mit Standard-Immunglobulin-Lösungen (Anti-Ig G I, II, III; Anti Ig A I, II, III; Anti Ig M I, II, III) beschickt (Tabelle Nr. 1; S. 43).

b) Ergebnisse

Durchmesser ($\emptyset$) bzw. quadrierter Durchmesser der Praecipitationszylinder (Halos):

Ig G Solution I: 24,50 mm²
(43 mg/100 ml)

Ig G Solution II: 43,25 mm²
(100 mg/100 ml)

Ig G Solution III: 73,65 mm²
(191 mg/100 ml)

Die Solutions I bis III sind für Ig G, Ig A und Ig M bei der Firma Behringwerke AG mit den, wie beschrieben definierten Konzentrationen erhältlich.

Tri-Partigen^(R) - Platte Ig G 1

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
30	ohne Hemmkreis	
33	ohne Hemmkreis	
36	ohne Hemmkreis	
39	ohne Hemmkreis	
42	ohne Hemmkreis	
45	2,7 mm	7,65 mm ²
48	3,6 mm	12,95 mm ²
51	3,8 mm	14,45 mm ²
54	8,8 mm	77,45 mm ²

Tri-Partigen^(R) - Platte Ig G 2

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
57	6,0 mm	36,00 mm ²
60	6,3 mm	39,70 mm ²
63	7,8 mm	60,65 mm ²
66	5,6 mm	31,35 mm ²
69	12,2 mm	148,84 mm ²
72	12,1 mm	146,41 mm ²
75	6,7 mm	44,90 mm ²
78	7,8 mm	60,85 mm ²
81	5,4 mm	29,15 mm ²

Tri-Partigen^(R) - Platte Ig G 3

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
84	6,5 mm	42,25 mm ²
87	5,7 mm	32,50 mm ²
90	4,2 mm	17,65 mm ²
93	3,7 mm	13,70 mm ²
96	ohne Hemmkreis	
99	ohne Hemmkreis	
102	3,6 mm	12,95 mm ²
105	4,9 mm	24,01 mm ²
108	4,0 mm	16,00 mm ²

Tri-Partigen^(R) - Platte Ig G 4

Fraktionsglas-Lösungen Nr. 110 bis 134 zeigten keine Praecipitations-
zylinder auf der Platte.

Ig A Solution I: 22,00 mm²
(58 mg/100 ml)

Ig A Solution II: 49,00 mm²
(175 mg/100 ml)

Ig A Solution III: 86,50 mm²
(340 mg/100 ml)

Tri-Partigen^(R) - Platte Ig A 1

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
30	ohne Hemmkreis	
33	ohne Hemmkreis	
36	ohne Hemmkreis	
39	ohne Hemmkreis	
42	ohne Hemmkreis	
45	3,4 mm	11,55 mm ²
48	4,8 mm	23,00 mm ²
51	5,2 mm	27,00 mm ²
54	5,7 mm	32,50 mm ²

Tri-Partigen^(R) - Platte Ig A 2

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
57	6,7 mm	44,90 mm ²
60	9,5 mm	90,25 mm ²
63	8,0 mm	64,00 mm ²
66	7,8 mm	60,85 mm ²
69	10,4 mm	108,15 mm ²
72	8,2 mm	67,25 mm ²
75	8,2 mm	67,25 mm ²
78	7,1 mm	50,40 mm ²
81	6,2 mm	38,45 mm ²

Tri-Partigen^(R) - Platte Ig A 3

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
84	4,3 mm	18,50 mm ²
87	3,6 mm	12,95 mm ²
90	3,6 mm	12,95 mm ²
93	3,6 mm	12,95 mm ²
96	ohne Hemmkreis	
99	ohne Hemmkreis	
102	ohne Hemmkreis	
105	ohne Hemmkreis	
108	ohne Hemmkreis	

Ig M Solution I: 21,16 mm²
(63 mg/100 ml)

Ig M Solution II: 31,36 mm²
(125 mg/100 ml)

Ig M Solution III: 52,56 mm²
(261 mg/100 ml)

Tri-Partigen^(R) - Platte IgM 1

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
30	ohne Hemmkreis	
33	ohne Hemmkreis	
36	ohne Hemmkreis	
39	3,1 mm	9,60 mm ²
42	3,8 mm	14,45 mm ²
45	4,0 mm	16,00 mm ²
48	4,5 mm	20,25 mm ²
51	4,8 mm	23,00 mm ²
54	5,8 mm	33,65 mm ²

Tri-Partigen (R) - Platte Ig M 2

Glas-Nr.	Hemmkreis-Durchmesser	quadriert
57	5,4 mm	29,15 mm ²
60	5,7 mm	32,50 mm ²
63	5,4 mm	29,15 mm ²
66	5,6 mm	31,35 mm ²
69	5,7 mm	32,50 mm ²
72	3,2 mm	10,25 mm ²
75	4,0 mm	16,00 mm ²
78	ohne Hemmkreis	
81	ohne Hemmkreis	

Tri-Partigen (R) - Platte Ig M 3

Die Lösungen der Fraktionsgläser Nr. 84 bis 108 zeigten keine Praecipitationszylinder auf der Platte.

Die Umrechnung dieser ausgemessenen und berechneten Werte auf mg/100 ml bzw. nach der neuen internationalen Standardisierung auf Internationale Einheiten/ml (I.E./ml) bringt Tabelle Nr. 2, Seite 27 .

In den Abbildungen 8, 9 und 10 sind die absoluten Konzentrationen der Immunglobuline (bzw. der Bruchstücke derselben) in den einzelnen Fraktionen graphisch auf die Fraktionierungskurve projiziert eingetragen. Abbildung Nr. 10 a zeigt die Konzentrationen in mg/100 ml.

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich ein Großteil der Immunglobuline und ihrer Bruchstücke (mit einem MG zwischen 150 000 und 80 000) in den Fraktionen 60 bis 80 erfassen läßt.

Von größtem Interesse für uns ist der kleine Peak bei Ig G in den Fraktionen 99 bis 111 (Abb. Nr. 8), da es sich hier offenkundig um niedermolekulare Spaltprodukte des Ig G mit einem Molekulargewicht von ca. 35 000 handelt.

Abb. Nr. 8

Absolute Konzentrationen von Ig G pro Fraktion.

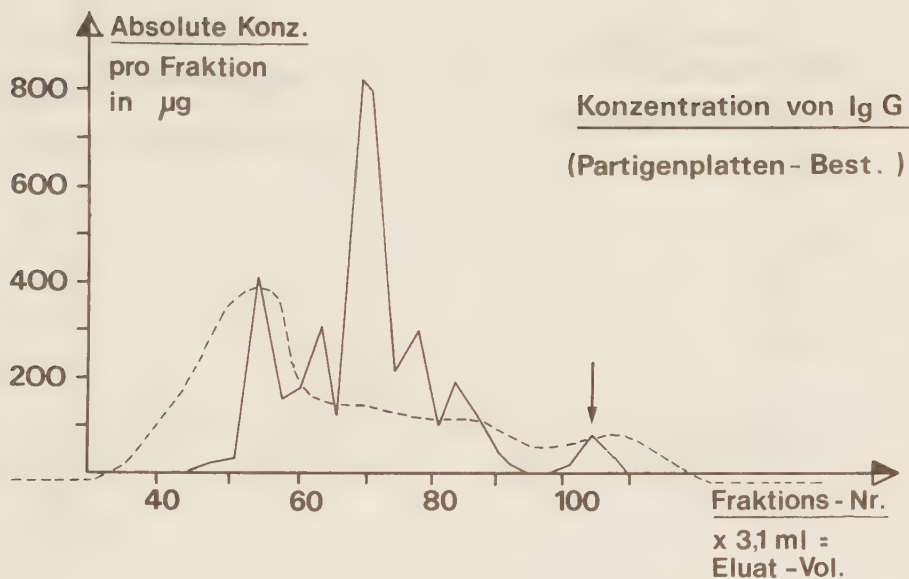


Abb. Nr. 9

Absolute Konzentrationen von Ig A pro Fraktion.

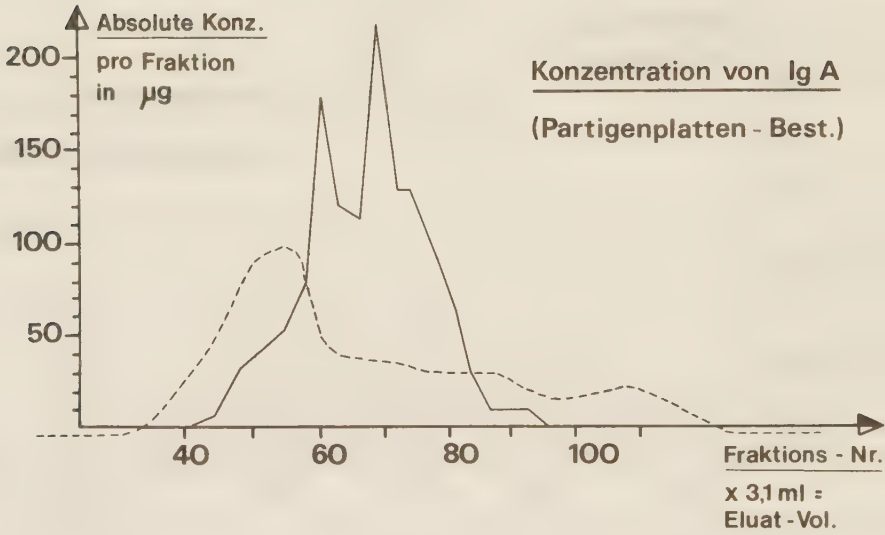


Abb. Nr. 10

Absolute Konzentrationen von Ig M pro Fraktion.

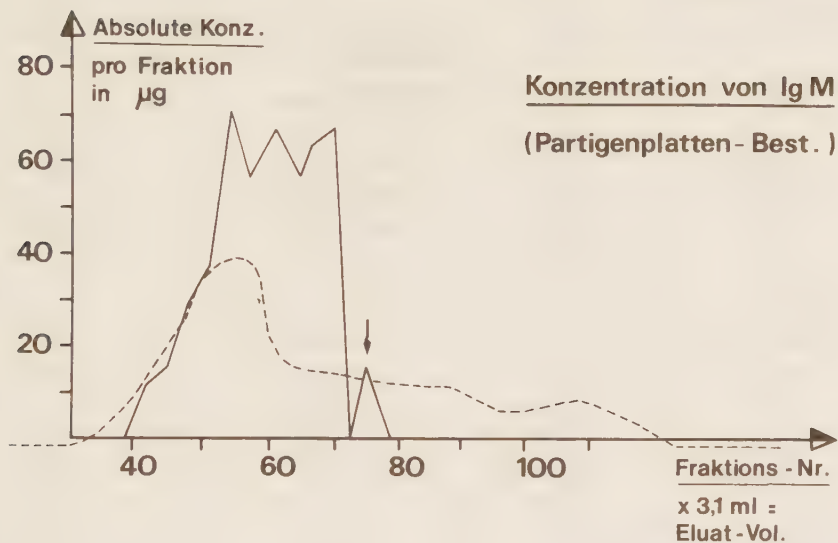
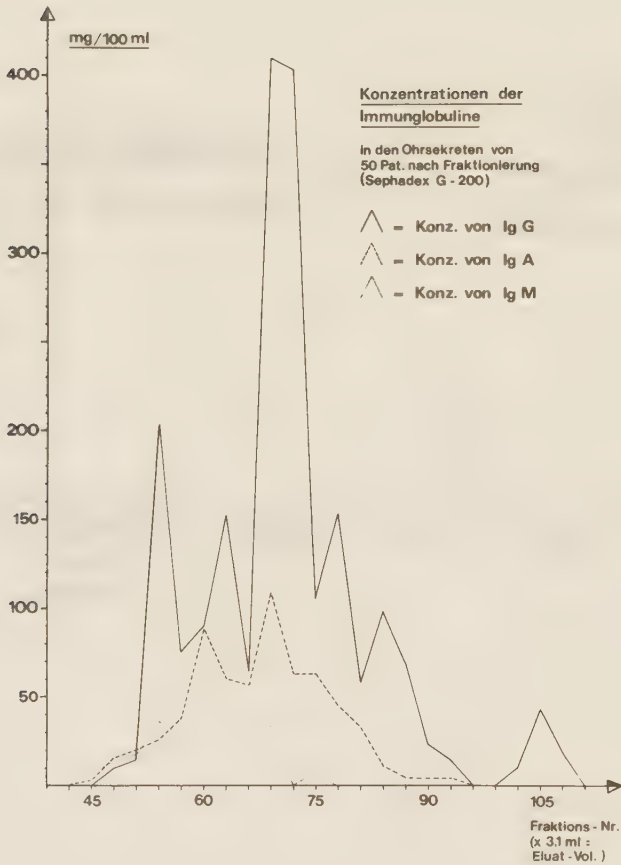


Abb. Nr. 10 a

Konzentrationen der Immunglobuline in den einzelnen Fraktionen in mg/100 ml.



Tab.Nr. 2

Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen

a) in mg/100 ml; b) in I.E./ml *)

a) Konzentrationen von Ig G, Ig A und Ig M in mg/100 ml:

Glas-Nr.	Ig G	Ig A	Ig M
42	-	-	5,5
45	-	-	7,2
48	10,0	15,5	14,5
51	14,5	20,7	18,2
54	203,0	26,0	35,2
57	77,5	38,2	28,2
60	89,5	88,5	33,7
63	152,0	60,0	28,2
66	64,0	56,5	31,7
69	411,0	108,5	33,5
72	404,0	64,0	7,5
75	105,0	64,0	-
78	152,0	45,2	-
81	58,0	32,1	-
84	97,5	11,2	-
87	68,5	4,5	-
90	23,5	4,5	-
93	12,0	4,5	-
96	-	-	-
99	-	-	-
102	10,0	-	-
105	43,0	-	-
108	19,0	-	-
110	-	-	-

*) bezogen auf Standard-Human-Serum Behringwerke AG

b) Konzentrationen von Ig G, Ig A und Ig M in I.E./ml:

Glas-Nr.	Ig G	Ig A	Ig M
42	-	-	6,32
45	-	-	8,34
48	0,11	0,18	16,67
51	0,17	1,23	20,99
54	2,33	1,55	40,54
57	0,89	2,28	32,49
60	1,03	5,27	38,81
63	1,75	3,57	32,49
66	0,74	3,36	36,51
69	4,73	6,46	38,52
72	4,65	3,81	8,62
75	1,21	3,81	-
78	1,75	2,55	-
81	0,67	1,91	-
84	1,12	0,67	-
87	0,79	0,26	-
90	0,27	0,26	-
93	0,14	0,26	-
96	-	-	-
99	-	-	-
102	0,11	-	-
105	0,49	-	-
108	0,22	-	-
110	-	-	-

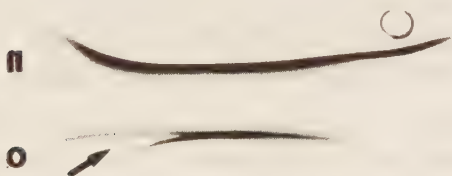
3. Immunelektrophoretischer Nachweis von Bruchstücken der Immunglobuline

a) Immunelektrophorese der gesamten 50 Pat. Sekrete, die fraktioniert wurden

Das erhaltene Elektrophoresebild mit Anti-Ig G-Serum zeigte das Vorkommen von Immunglobulin-Bruchstücken an, die sich hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und -richtung vom intakten Ig G unterscheiden (Abb. Nr. 11).

Abb. Nr. 11

Elektrophoresebild der aufbereiteten Lösung aller 50 Pat. Sekrete, die später fraktioniert wurden.



b) Nachweis der Bruchstücke und Einordnung nach Molekulargewicht

Von den Lösungen der Fraktionen, die in der Fraktionierungskurve Peaks ergeben, wurden Elektrophoresen gegen Anti Ig G, Anti Ig A und Anti Ig M-Seren hergestellt.

Gegen Anti Ig A-Serum und Anti Ig M-Serum ließen sich immunelektrophoretisch keine Bruchstücke in Form von Doppellinien nachweisen. Allerdings sah man, daß mit ansteigender Fraktionszahl die Vollständigkeit der Praecipitationslinien im Vergleich zum intakten Immunglobulin abnahm.

Gegen Anti Ig G-Serum ließen sich im Elektrophoresebild Bruchstücke bzw. Abbauprodukte des Immunglobulins nachweisen, welche sich in Form von Doppellinien zeigten. Gesichert wurde der Nachweis dadurch, daß zuzüglich zur untersuchten Lösung Standard-Human-Serum in die Auftragstelle eingebracht wurde, wobei sich auch in diesem Fall Doppellinien zeigten. Dies bedeutet einen Hinweis darauf, daß sich neben intakten Immunglobulin-Molekülen (vom Standard-Human-Serum herstammend) auch Antikörper in der Lösung befinden, deren Determinanten-Muster sich aber von dem Determinanten-Muster der intakten Antikörper bereits soweit unterscheiden, daß es zur Ausbildung von Doppellinien kommt.

Elektrophoresen mit den Lösungen der Fraktionen zweier benachbarter Peaks auf der Fraktionierungskurve bestätigten dies.

Während die Fraktion Nr. 69 (MG ca. 105 000) mit den speziell definierten Bruchstück-Antisera für Ig G (Fab); Ig G (Fd); Ig G (Fc) Praecipitationslinien bildet, stellen wir bei den gleichen Untersuchungen in der Fraktion Nr. 105 (MG ca. 40 000 bis 45 000) fest, daß es zu keiner Praecipitatbildung kommt.

Hieraus läßt sich schließen, daß die hier vorliegenden Abbauprodukte auf Grund der fehlenden Bindungsbereiche infolge der weitgehenden Aufspaltung nicht mehr mit den definierten Bruchstück-Antisera reagieren können.

Zugleich ließ sich auch bei Ig G feststellen, daß mit abnehmendem Molekulargewicht in den Fraktionen die Vollständigkeit der Praecipitationslinien im Vergleich zum intakten Ig G abnimmt.

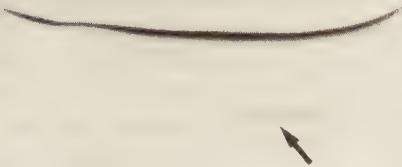
Es fällt auf, daß die kathodischen und anodischen Bereiche der Praecipitationslinien als erste abgebaut werden.

Wie weit dieser Abbau erfolgen kann zeigt die Abb. Nr. 12.

Abb. Nr. 12

oberes Praecipitat: intaktes Immunglobulin

unteres Praecipitat: abgebautes Immunglobulin aus Fraktion Nr. 87



D. DISKUSSION

Wie zu erwarten war, treten die Antikörper der drei Immunglobulin-Klassen Ig G, Ig A und Ig M im chronisch entzündeten Mittelohrsekret nahezu regelmäßig auf. Die Proportionen zwischen dem Gehalt der Antikörper im Sekret unterscheiden sich nicht wesentlich vom Serum-Profil dieser drei Klassen, eine Tatsache, die bereits Beckmann und Terrahe (15) beschrieben. Bei ihren quantitativ geführten Untersuchungen von nicht fraktionierten, chronisch entzündlichen Mittelohrsekreten stellten sie einen gesamt durchschnittlichen Immunglobulingehalt im Sekret von

Ig G = 704 mg/100 ml

Ig A = 128 mg/100 ml

Ig M = 56 mg/100 ml

fest. Einen auffälligen Mangel der drei Immunglobulin-Klassen im Mittelohrsekret bei chronisch entzündlichen Veränderungen - wie er etwa bei chronischer Bronchitis im Bronchial-System gefunden wurde - stellten sie hierbei nicht fest, woraus sie die Folgerung zogen, daß ein quantitatives Defizit an protektiven Antikörpern wohl nicht die Ursache der Chronifizierung von Mittelohreiterungen sein kann (15).

Die Schädlichkeit von *Pseudomonas aeruginosa* beruht auf der hohen Produktionsrate sehr aktiver Proteasen mit einem pH-Optimum im physiologischen Bereich (16).

Es handelt sich dabei um mindestens drei Proteasen, von denen eine Elastase-Eigenschaften besitzt (17; 18).

Auch Meinke (19) führt die hohe Pathogenität dieses Keimes auf die große Proteasenproduktion zurück.

Trotz der natürlich vorhandenen Proteasen-Inhibitoren konnten wir in allen entzündlichen Mittelohrsekreten proteolytische Aktivitäten nachweisen, ein Hinweis auf die Schwächung des inhibitorischen Systems.

Nach Muszynski (21) besteht zwischen der Virulenz und der Proteasen-

produktion von *Pseudomonas aeruginosa* ein direkter Zusammenhang.

Diese Aussagen ließen die Vermutung zu, daß die, bei Entzündungen vermehrt aus Gewebszellen, Leukozyten und vor allem aus Bakterien freiwerdenden Proteasen das Inhibitor-Schutzsystem überspielen und darüber hinaus noch einen schädigenden Einfluß auf das Immunglobulin-System ausüben, indem sie nämlich die, über die Blutbahn herangeführten oder lokal gebildeten Antikörper der drei Hauptimmunglobulin-Klassen abbauen bzw. spalten.

Als Entstehungsort eines niedermolekularen Inhibitors kämen im physiologisch normalen Mittelohr die Becherzellen des Tubenwinkels in Frage. Andererseits scheint die Herkunft aus den Becherzellen insofern nicht als wahrscheinlich, als in anderen, mit Becherzellen ausgestatteten Schleimhäuten, wie z. B. im Darm, bislang kein Inhibitor nachgewiesen wurde (20).

Die chronisch entzündlich veränderte Paukenschleimhaut weist eine schleimige Metamorphose ihres Epithels auf. Verbunden damit ist das gehäufte Auftreten von Becherzellen und intraepithelialen Drüsen, sowie submukös gelegener, rudimentär azinös-glandulärer Strukturen, welche insgesamt auch die Herkunft des Ohrsekretes bei chronischen Entzündungen begründen (15).

Mit Hilfe der Immunelektrophorese gelang uns der Nachweis, daß das Immunglobulin-System durch die Proteasen geschädigt wird, da sich im Elektrophoresebild eindeutig Spaltprodukte darstellen ließen.

Ohrsekrete von Entzündungen mit *Pseudomonas aeruginosa* wiesen regelmäßig Bruchstücke im Elektrophoresebild auf, Sekrete mit anderer Keimbeseiedelung jedoch nur in vereinzelt Fällen.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Patientenauswahl

Zur Untersuchung wurden Sekrete aus den Mittelohren von Patienten mit folgenden Krankheitsbildern herangezogen:

- Patienten mit chronischer Otitis media bei Cholesteatomen,
- Patienten mit Schleimhauteiterungen bei zentralem Trommelfell-Defekt.

II. Sekretaufbereitung

1. Sekretentnahme

Sie erfolgte durch direkten Abstrich mit einem Watte-Tupfer aus dem Mittelohr über den äußeren Gehörgang.

2. Weitere Zubereitung

Die Watte mit dem Sekret wurde im Reagenzglas mit 2 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und mit einer Rekord-Einmal-Spritze ausgepreßt; die so erhaltene Lösung 10 Minuten bei 5000 U/min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde in gewässerte Kollodium-Hülsen eingefüllt und mittels Unterdruck durch eine Wasserstrahlpumpe eingeengt.

3. Aufbewahrung

Die Aufbewahrung der gänzlich eingeengten Sekrete bis zur Verarbeitung erfolgte bei + 4 Grad Celsius.

Vor ihrer Verwendung zu den Untersuchungen wurden 0,2 ml physiologischer Kochsalzlösung zugegeben, um die Bestandteile in Lösung gehen zu lassen.

III. Zweidimensionale Doppel-Immundiffusion nach Ouchterlony (22)

1. Material

- Agar purum (Behringwerke AG)
- Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer (Veronal-Puffer) nach Michaelis (23)
- Aqua bidest
- Thiocid (= Natrium-p-äthyl-mercuri-mercapto-benzoe-sulfonat)
- Spezifische Antisera vom Kaninchen gegen Human-Immunglobuline

2. Methode

a) Herstellen der Stammlösung

13,38 g Natrium-diäthylbarbiturat und
8,83 g Natriumacetat-trihydrat werden in
1,5 l Aqua bidest. gelöst. Man stellt mit
0,1 N HCl (ca. 180 ml) den pH-Wert von
8,2 genau ein.

Die Lösung hat dann eine Ionenstärke von $\mu = 0,1$.

b) Herstellen der Agargel-Mikroplatten

2 g Agar purum werden in einer Mischung von
50 ml Veronal-Puffer und
50 ml Aqua bidest. bis zur Bildung einer klaren Lösung im siedenden Wasserbad erhitzt. Zur besseren Konservierung gibt man
10 mg Thiocid bei.

Jeweils 3 ml heißer Lösung werden mittels einer Pipette auf fettfreie Objektträger (7,5 cm x 2,5 cm, mit Chromschwefelsäure gereinigt) aufgetragen. Um eine gleichmäßig dicke Gelschicht auf den Trägern zu erhalten, liegen diese auf einem kleinen, ausnivellierten Tisch völlig waagrecht.

Nach Erstarren des Agars werden mit einer dazu geeigneten Stanze Löcher für die Aufnahme des Antiserums bzw. der Antigenlösungen angebracht. Das Absaugen der vorgestanzten Gelstückchen erfolgt mit einer abgeschliffenen Injektionsnadel Nr. 1, die an ein Vakuum (Wasserstrahlpumpe) angeschlossen wird.

c) Aufbewahrung

Bis zur Bearbeitung oder während der Praecipitatbildung in einer feuchten Kammer.

d) Beschicken der Träger

5 μ l des betreffenden Antiserums werden mit einer Hamilton-Mikro-liter-Spritze (Nr. 7005 N oder 701 N) in das mittlere Loch eingefüllt.

e) Bildung der Immunpraecipitate

Die beschickten Objektträger werden 24 bis 48 Stunden in eine feuchte Kammer gestellt. In dieser Zeit diffundieren Antigen-Lösung und Antiserum aufeinander zu und bilden beim Zusammentreffen die typischen Immunpraecipitate.

f) Fixierung des Praecipitatbildes

Die Agarplättchen mit den Immunpraecipitaten werden ein bis zwei Tage mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um alles nicht praecipitierte Protein aus dem Agar zu entfernen.

Die gewaschenen Agarplättchen, die auf dem Objektträger verbleiben, werden mit Filtrierpapierstreifen bedeckt und unter leichtem Druck an der Luft getrocknet.

Die Anfärbung der Praecipitate erfolgt innerhalb von 45 bis 60 Mi-

nuten in einem Tauchbad folgender Lösung:

5 g Commassie-Blue, gelöst in
450 ml Methanol und
450 ml Aqua bidest. und
100 ml 98 %iger Essigsäure (Eisessig)

Das Entfärben der nicht praecipitierten Anteile im Gel wird mit einer Lösung vorgenommen, die der Färbelösung gleicht, allerdings keinen Commassie-Blue Farbstoff enthält.

Zur besseren Konservierung der gefärbten Immunelektrophorese-Platten werden diese nach dem Trocknen mit 1 ml einer 20 %igen Lösung von Diatex^(R) in Xylol überschichtet und zwei Tage getrocknet.

Das so erhaltene Bild kann nun zu Zwecken der Dokumentation photographiert werden, wobei sich eine Überschichtung mit Wasser als nützlich erweist, da die Lichtbrechung des Objektträgerglases vermieden wird.

g) Auswertung

Die Auswertung der Praecipitate erfolgt im schräg durchfallenden Licht vor dunklem Hintergrund.

Es ist nur eine qualitative Aussage möglich.

IV. Immunelektrophorese (24)

1. Prinzip

Die erstmals 1953 mitgeteilte, von Grabar und Williams (25) entwickelte Methode der Immunelektrophorese stellt die Kombination eines physikalisch-chemischen und eines immun-chemischen Untersuchungsverfahrens dar.

Im Agargel werden zunächst die, in den bei uns verwendeten Ohrsekreten vorkommenden Proteingemische elektrophoretisch aufgetrennt und dann der Einwirkung eines praecipitierenden Antiserums ausge-

setzt.

Dies geschieht in der Weise, daß man das in eine Rinne im Agar gebrachte Antiserum gegen die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine diffundieren läßt. Beim Zusammentreffen mit den jeweils entsprechenden Antigenen im Agar bilden sich gut erkennbare Praecipitate.

Wir bedienten uns bei unseren Untersuchungen der Mikromethode der Immunelektrophorese nach Scheidegger (26).

2. Reagentien und Geräte

- Agar purum (Behringwerke AG)
- Diäthylbarbiturat-Acetat-Puffer (Veronal-Puffer nach Michaelis (23))
- Aqua bidest.
- Thiocid
- Standard-Human-Serum (Behringwerke AG)
- Spezifische Antisera gegen Human-Immunglobuline:
 - Anti Ig G-Serum
 - Anti Ig A-Serum
 - Anti Ig M-Serum
 - Anti Ig G(Fab)-Serum
 - Anti Ig G(Fb) -Serum
 - Anti Ig G(Fc) -Serum

Alle Sera waren vom Kaninchen gewonnen und wurden durch die Firma Behringwerke AG bezogen.

- Zur Verwendung kam eine handelsübliche Immunelektrophorese-Apparatur mit den notwendigen Zusatzgeräten.

3. Methode

a) Herstellung der Agargel-Mikroplatten

Die Plattenherstellung wurde bereits im Prinzip unter der Nummer E III 2 b bei der zweidimensionalen Doppeldiffusion nach Ouchter-

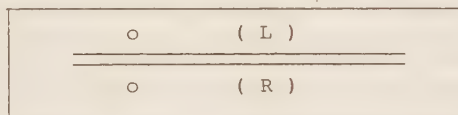
lony beschrieben. Ein Unterschied besteht allerdings im Aussehen der Auftragstellen für Antiserum und Antigen-Lösungen.

Eine zentrale Rinne, die sich fast über die ganze Objektträgerlänge erstreckt, dient zur Aufnahme des Antiserums. Zwei im Gel ausgestanzte Löcher links und rechts neben der Rinne, im ersten Drittel des Objektträgers dienen zur Aufnahme von:

- Antigenlösung oder
- Human-Standard-Serum (zur Kontrolle)
- oder einer Mischung aus beiden.

Abb. Nr. 13

Immunelektrophoreseträger (Mikroplatte)



Maße:

Rinne: 1,0 mm x 55 mm

Loch: 1,0 mm im Durchmesser

Abstand Rinne - Loch = 3,0 mm

(L): linke Auftragsstelle

(R): rechte Auftragsstelle

b) Aufbewahrung

Bis zur Verarbeitung oder während der Praecipitatzbildung in einer feuchten Kammer.

c) Beschicken

Jeweils 5 µl der zu untersuchenden Antigen-Lösung werden in die linke Auftragsstelle (L) eingefüllt.

In der Auftragstelle gegenüber werden zur Kontrolle des Verlaufes der Immunelektrophorese 5 μ l Standard-Human-Serum eingefüllt.

d) Elektrophorese

Auf dem wassergekühlten Steg, der die beiden mit Pufferlösung (Veronal-Puffer nach Michaelis) gefüllten Tröge der Immunelektrophorese-Kammer verbindet, werden die mit Antigen-Lösung beschickten Mikroplatten absolut waagrecht nebeneinander angeordnet.

Der Kontakt mit der Puffer-Lösung wird durch angefeuchtete Filtrierpapier-Streifen (Schleicher und Schüll Nr. 2043 b) hergestellt, die auf beiden Seiten der Objektträger fest auf der Agarschicht aufliegen müssen.

Die Spannung, welche zur Protein-Auftrennung verwendet wird beträgt, 45 Volt (6 Volt/cm) zwischen den Objektträgerenden, von Elektrode zu Elektrode ca. 180 bis 190 Volt.

Die Auftrennung erfolgt über einen Zeitraum von 45 Minuten.

e) Einfüllen des Antiserums

Nach beendeter Elektrophorese wird der Agar aus der vorgestanzten Rinne für die Aufnahme des Antiserums mit Hilfe einer schräg geschliffenen Nadel herausgehoben.

In diese Rinne werden nun 0,04 bis 0,06 ml des zur Untersuchung benötigten Antiserums mit einer Mikroliter-Spritze eingefüllt und die so beschickten Agarplättchen werden bis zur Ausbildung der Immunpraecipitate (24 bis 48 Stunden) in die feuchte Kammer gestellt.

f) Fixierung des Praecipitatbildes

Sinngemäß wie unter E. III. 2. e) angeführt.

g) Auswertung

Die Auswertung des erhaltenen Immunelektrophoresebildes ist abhängig von der jeweiligen Fragestellung und somit auch von den jeweils verwandten Antigen-Lösungen und Antisera. Die Besprechung erfolgt bei den Untersuchungsergebnissen.

V. Einfache radiale Immundiffusion nach Mancini (27)

1. Prinzip

Als Reagentien für quantitative Bestimmungen der Konzentration von Immunglobulinen verwendet man spezifische Antisera, die mit den zu bestimmenden Proteinen stöchiometrisch unter Ausbildung von Praecipitaten reagieren (28).

Gelöste Antigenmoleküle diffundieren radial von einem zylinderförmigen Startloch aus in eine gleichmäßig dicke, das homologe Antiserum enthaltende Agargelschicht unter Ausbildung eines Praecipitatzylinders (Halos). Die kreisförmige Grundfläche des Zylinders ist nach beendeter Diffusion direkt proportional der Menge des Antigens bei vorgegebener Antiserumkonzentration im Reaktionsgel (29).

2. Reagentien und Geräte

Bei unseren Untersuchungen wurden ausschließlich handelsübliche, gebrauchsfertige Antiserum-Agargel-Immundiffusionsplatten (Tri-Partigen^(R)-Immundiffusionsplatten der Behringwerke AG) verwandt.

Zum Auftragen der Antigen-Lösungen wurde eine Hamilton Mikroliter-Spritze Nr. 7005 N verwendet.

Zum Erstellen einer Eichkurve für die Immunglobulin-Konzentrationen wurden Standard-Immunglobulin-Lösungen der Behringwerke AG verwendet (Ig G I, II, III; Ig A I, II, III; Ig M I, II, III; siehe auch Tab. Nr. 1).

Das Ausmessen der Praecipitattendurchmesser wurde mit einer handelsüblichen Meßschablone auf 0,1 mm genau vorgenommen.

3. Methode (30)

a) Beschicken

Die handelsübliche Tri-Partigen^(R)-platte wird bei Zimmertemperatur 5 Minuten geöffnet, um eventuell in die Auftragstellen eingedrungenes Kondenswasser verdunsten zu lassen.

Die Auftragstellen 1 bis 3 werden mit jeweils 0,005 ml der Standard-Immunglobulinlösung beschickt (Tab. Nr. 1).

Die Auftragstellen 4 bis 12 stehen für die zu untersuchenden Antigen-Lösungen zur Verfügung.

b) Praecipitatbildung

Die so beschickten Platten bleiben bei Zimmertemperatur fest verschlossen, bis sich Praecipitatzylinder gebildet haben.

Unterschiedliche Reaktionstemperaturen beeinflussen das Meßergebnis nicht, allerdings sollten Temperaturen um 37° C und darüber vermieden werden, da es sonst zur Verflüssigung des Gels und zur irreversiblen Schädigung der Reaktionspartner kommen könnte.

Bis zur endgültigen Ausbildung der Praecipitationszylinder gelten folgende Mindest-Diffusionszeiten:

Ig G: ca. 50 Stunden

Ig A: ca. 50 Stunden

Ig M: ca. 80 Stunden

Nach dieser Zeit können die Durchmesser der Zylinder mit der Meßschablone auf 0,1 mm genau bestimmt werden.

c) Aufstellung der Bezugskurven

Die ermittelten Durchmesser der Praecipitationszylinder, die sich bei den Auftragstellen mit den Standard-Immunglobulin-Lösungen entwickelt haben, werden auf linearem Millimeterpapier, in Abhängigkeit von der jeweiligen Immunglobulin-Konzentration der Standard-Lösungen aufgetragen und ergeben so, miteinander verbunden, eine leicht nach oben durchgebogene Kurve.

Trägt man die quadrierten Durchmesser der Standard-Zylinder als Funktion der bekannten Standard-Konzentration auf linearem Millimeterpapier auf, so resultiert daraus eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate zwischen 8,5 und 13,5 mm² liegen muß (31).

Die Konzentrationswerte für die Analysen-Lösungen ermittelt man durch Ausmessen der jeweils entstandenen Praecipitations-Zylinder. Zu den quadrierten Durchmessern werden die zugehörigen Immunglobulin-Konzentrationen auf der Bezugsgeraden abgelesen. Nach Multiplikation mit dem zu berücksichtigenden Verdünnungsfaktor ergibt sich der gesuchte Gehalt des jeweiligen Immunglobulins, bezogen auf die Volumeneinheit der unverdünnten Untersuchungsprobe.

Tab. Nr. 1

Konzentrationen der Standard-Immunglobulin-Lösungen:

Ig G: Solution I:	43 mg/100 ml (= 5,0 I.E./ml)
Solution II:	100 mg/100 ml (= 11,5 I.E./ml)
Solution III:	191 mg/100 ml (= 22,0 I.E./ml)
Ig A: Solution I:	63 mg/100 ml (= 72,0 I.E./ml)
Solution II:	125 mg/100 ml (= 144,0 I.E./ml)
Solution III:	261 mg/100 ml (= 300,0 I.E./ml)

Ig M: Solution I: 58 mg/100 ml
(= 34,5 I.E./ml)
Solution II: 175 mg/100 ml
(= 104,0 I.E./ml)
Solution III: 340 mg/100 ml
(= 202,0 I.E./ml)

Die Abbildungen Nr. 14, 15 und 16 zeigen die ermittelten Bezugsgeraden zur Berechnung der Immunglobulin-Konzentrationen der Analysen-Lösungen für Ig G, Ig A und Ig M.

Abb. Nr. 14

Bezugsgerade für Ig G.

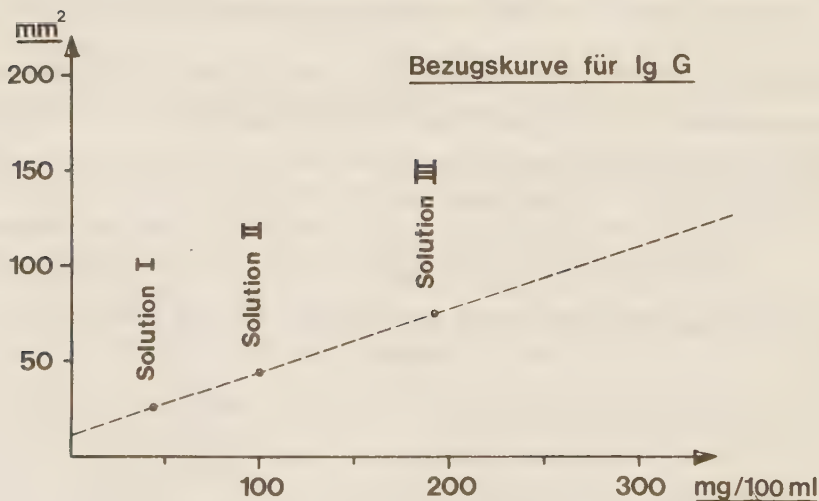


Abb. Nr. 15

Bezugsgerade für Ig A.

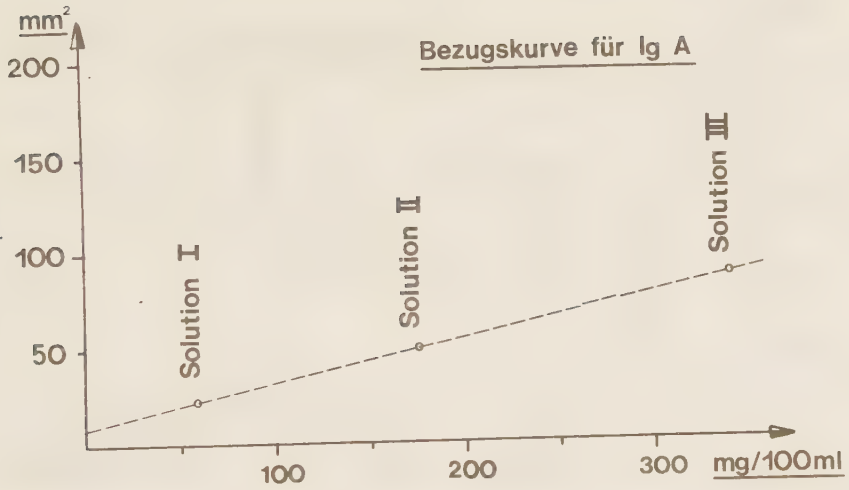
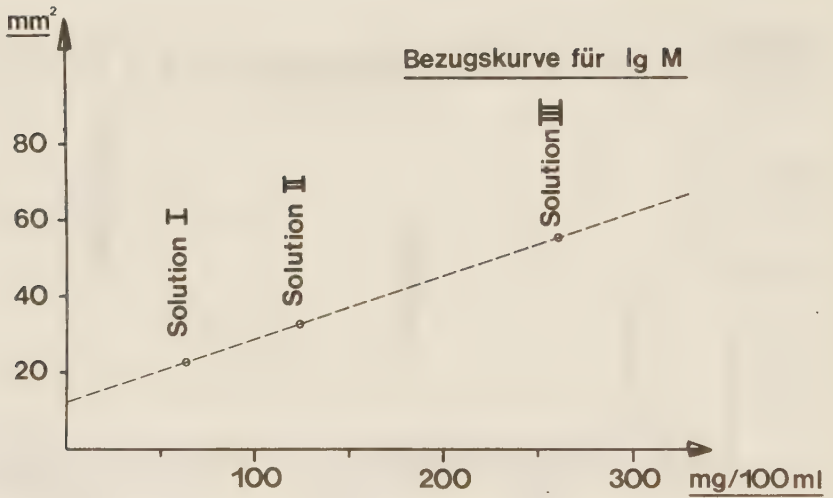


Abb. Nr. 16

Bezugsgerade für Ig M.



d) Internationale Standardisierung quantitativer Immunglobulin-Bestimmungen (32)

Hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Eigenschaften sind Standard-Immunglobulin-Lösungen in ihrer handelsüblich in mg/100 ml angegebenen Immunglobulin-Konzentration nicht vergleichbar (33).

Die Weltgesundheitsbehörde hat ein lyophilisiertes Human-Serum (Code Nr. 67/86) als internationales Standard für die Immunglobuline Ig G, Ig A und Ig M anerkannt (34; 35).

"Per definitionem" enthält eine Ampulle mit 81,47 mg lyophilisiertem Serum je 100 internationale Ig G, Ig A und Ig M-Einheiten.

Mit der Methode der einfachen radialen Immundiffusion (Tri-Partigen^(R)-Immundiffusionsplatten der Behringwerke AG) wurde ein Vergleich dieser Standard-Seren mit den handelsüblichen - auch hier verwendeten - Standard-Immunglobulinen und Kontroll-Seren der Behringwerke AG durchgeführt.

Dabei ergab sich folgende Beziehung zwischen den, von den Behringwerken AG angegebenen Immunglobulin-Konzentrationen (mg/100 ml) und den Internationalen Einheiten:

1 mg Ig G entspricht 11,5 Internationalen Ig G-Einheiten

1 mg Ig A entspricht 59,5 Internationalen Ig A-Einheiten

1 mg Ig M entspricht 115,0 Internationalen Ig M-Einheiten

Auch bei unseren Ergebnissen werden jeweils beide Maßeinheiten angegeben.

VI. Gelfiltration mit Sephadex^(R)-G 200 Molekulargewichtsbestimmung (36)

1. Prinzip

Sephadex^(R)-G 200* ist ein modifiziertes Dextran, dessen Polysaccharidketten zu einem dreidimensionalem Raumnetz vernetzt werden.

* Sephadex^(R)-G 200 von Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala/Schweden.

Im gequollenem Zustand, unter Verwendung eines geeigneten Puffers, bietet es als Säulenfüllung die Möglichkeit, Moleküle auf Grund ihrer Molekulargröße zu trennen.

Während sich kleinere Moleküle eher in dem dreidimensionalen Netzwerk verfangen, "fallen" größere Moleküle geradezu zwischen den einzelnen Sephadex-Partikeln durch und "drängen" diese einfach zur Seite.

Damit haben größere Moleküle beim Durchlauf der Säule einen kürzeren Weg zurückzulegen und erscheinen folgerichtig eher im Eluat.

Mit Hilfe dieser Auftrennungsmethode ist es möglich, sehr genau und differenziert das Molekulargewicht der im Eluat nacheinander erscheinenden Substanzen zu errechnen, wobei das jeweilige Eluat-Volumen ein wichtiger Faktor für diese Berechnungen ist.

2. Reagentien und Geräte

Sephadex^(R)-G 200 für Substanzen mit Molekulargewichten zwischen 5000 und 1 Million geeignet.

Borat-Puffer: 0,05 molar Di-Natrium-tetraborat-10 Hydrat
 0,10 molar NaCl
 pH = 8,0

Thiocid zur Konservierung.

Testsubstanzen:

5 mg Dextranblau	MG: 2 000 000
5 mg Ig G aus Human-Serum	MG: 150 000
5 mg Rinder-Albumin	MG: 68 000
50 mg Chymotrypsinogen	MG: 25 000
5 mg Cytochrom C	MG: 12 000

Es wurde eine Säulen-Apparatur mit Puffer-Reservoir, Säule und Anschluß an einen Fraktionierapparat verwendet. Zur Registrierung der Ergebnisse wurde ein Kurvenschreiber angeschlossen.

3. Methode

a) Packen der Säule

Es wurde eine Säule mit 148,0 cm Länge und 1,0 cm Radius verwendet. Das gequollene Sephadex^(R)-G 200 wird mit dem Borat-Puffer, pH = 8,0, zu einer leicht gießbaren Suspension verdünnt, deren Konsistenz so beschaffen ist, daß Luftblasen gerade noch ohne Schwierigkeiten aufsteigen können.

Nach dem Einfüllen der Suspension in das Glasrohr wird das Puffer-Reservoir angeschlossen und der Säulenauslauf geöffnet, wodurch die Säulenfüllung unter konstantem Druck gepackt werden kann. Dieser Arbeitsdruck sollte etwa 1 cm Wasserdruck pro 1 cm Säulenhöhe betragen.

b) Äquilibrieren der Säule

Die Säulenfüllung wird nach dem Packen mit mindestens zwei Bettvolumen Puffer vorgespült. Dabei wird einmal das System äquilibriert und zum anderen die Füllung stabilisiert.

c) Auftragen der Testsubstanzen

Die Testsubstanzen werden in 5 ml Puffer-Lösung aufgelöst. Der Überstand am Start-Puffer wird abpipettiert; bei geschlossenem Säulenablauf wird die Lösung mit den Testsubstanzen mit Hilfe einer Pipette auf die gerade noch feuchte Geloherfläche aufgetragen. Ein Aufwirbeln der Sephadex-Suspension ist hierbei zu vermeiden.

Sobald die Probe bei geöffnetem Auslauf in die Füllung eingezogen ist, wird der Säulenkopf mit geringen Mengen Startpuffer nachgewaschen und das Puffer-Reservoir für die Eluation angeschlossen und geöffnet.

Nun wird auch der Schreiber eingeschaltet und der Fraktionator in Betrieb gesetzt.

d) Testlauf

Die Fraktionierung der Testsubstanzen ist nötig, um Relationswerte für die Auswertung der Fraktionierung mit den Analysen-Lösungen zu erhalten.

So wird z. B. das äußere Volumen der Säulenfüllung mit der Größe des Volumens des Eluats, nach Erscheinen von Dextran (größtes MG der Testsubstanzen, "fällt" sozusagen ohne Widerstand durch die Säulenfüllung) wiedergegeben. Die anderen Testsubstanzen mit ihrem definierten Molekulargewicht ergeben zusammen mit ihrem jeweiligen Eluat-Volumen Relationswerte, die für die Erstellung einer Eichkurve zur Berechnung des Molekulargewichtes in den einzelnen Fraktionen dienen.

e) Erstellen der Eichkurve (36)

Nach Fraktionierung der Testsubstanzen erhält man vom Schreiber eine Kurve mit einzelnen Peaks, die dem Durchlauf der Testsubstanzen entsprechen.

Gleichzeitig wird die Fraktionierungszahl beim jeweiligen Peak gekennzeichnet.

Das jeweilige Eluat-Volumen errechnet sich aus Fraktionszahl, multipliziert mit der durchschnittlichen ml-Menge in den einzelnen Fraktionen.

Die Eichkurve erhält man, indem man die K_{av} -Werte der Testsubstanzen auf der Ordinate dem logarithmisch aufgetragenen Molekulargewicht auf der Abszisse zuordnet.

Für K_{av} gilt:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o};$$

V_e = jeweiliges Eluat-Volumen der Fraktion

V_o = äußeres Volumen der Säulenfüllung; entspricht dem Eluat-Volumen nach Erscheinen von Dextran (MG = 2 Mill.)

V_t = totales Füll-Volumen der Säule (Radius der Säule zum Quadrat,

multipliziert mit der Zahl 3,14 ... (π), multipliziert mit der Länge der Säule in cm.)

Trägt man diesen K_{av} -Wert, der zwischen Null und 1,0 liegt, für die einzelnen Testsubstanzen gegen das logarithmisch aufgezeichnete MG der definierten Testsubstanzen auf, so erhält man eine Kurve, die, je höher das MG ansteigt, umso steiler auf die Abszisse abfällt (Abb. Nr. 6, S. 14).

f) Analysen-Fraktionierung

5 bis 10 ml der zu untersuchenden Analysenlösung werden auf die Säule aufgetragen und nach Ablauf der gleichen Vorgänge, wie bei den Testsubstanzen beschrieben, liefert der Schreiber eine Kurve mit einzelnen Peaks, welche Proteinen der Analysen-Lösung in Anhäufung entsprechen und deren MG man nun mit der vorgenannten Methode berechnen kann.

g) Auswertung

Die Auswertung erfolgt je nach Aufgabenstellung und wird bei den Untersuchungsergebnissen jeweils besprochen.

VII. Proteolytische Aktivitätsbestimmung Azokaseintest (37)

1. Prinzip

Das unspezifische Proteasen-Substrat Azokasein wird von der Mehrzahl der bekannten Proteasen gespalten.

Bei der enzymatischen Hydrolyse von Azokasein entstehen säurelösliche, gefärbte Peptide, deren Konzentration spektrophotometrisch ein Maß für die Aktivität der Proteasen ist.

2. Material

- Gewebs-, Leukozyten- und Bakterien-Proteasen im fraktionierten Sekret von Patienten mit chronisch entzündlichen Mittelohreiterungen.
- 5 %ige Trichloressigsäure
- Azokasein (von der Firma Serva)
- Phosphat-Puffer 0,1 M; pH = 8,0
- Filterphotometer "Eppendorf" (von Netheler und Hinz GmbH, Hamburg)

3. Methode

Azokasein wird im Phosphat-Puffer gelöst (20 mg Azokasein/1 ml Puffer) und anschließend gekocht. Jeweils 1 ml Azokasein-Lösung und 0,5 ml Lösung der einzelnen Fraktionen werden bei 37° C im Wasserbad 4 Stunden inkubiert.

Durch Zugabe von 1,5 ml Trichloressigsäure wird die Reaktion gestoppt und nicht verdautes Substrat ausgefällt. Nach Abzentrifugieren (bei 6000 U/min.) wird der Überstand filtriert und gegen den Reagentienleerwert photometrisch bei 366 nm gemessen.

VIII. Bakteriologische Untersuchungen

Bei den bakteriologischen Untersuchungsergebnissen wurden die, in der Klinik für jeden stationären Patienten mit entsprechendem Krankheitsbild routinemäßig prae- und postoperativ erstellten, gutachtlichen Stellungnahmen des Max v. Pettenkofer-Institutes München verwendet.

Diese Befunde erstrecken sich auf die Feststellung und Identifizierung von Eiter- und Sepsiserregern im Ohrsekret, sowie auf eine Resistenzbestimmung dieser Erreger.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Die Intaktheit des inhibitorischen Systems, verbunden mit der Inhibition der Bakterien-, Leukozyten- und Gewebsproteasen, ist beim Entzündungsverlauf im Mittelohr von entscheidender Bedeutung.

Wird dieses inhibitorische System durch einen Überschuß an Proteasen überspielt, - wie dies etwa bei den chronisch entzündlichen Mittelohreiterungen mit starker Keimbesiedelung durch Keime der *Proteus-Providencia*-Gruppe und/oder vor allem durch *Pseudomonas aeruginosa* der Fall ist, - so wird durch die verstärkte proteolytische Aktivität und dem daraus resultierenden Abbau intakter Immunglobuline das gesamte Immunsystem im Mittelohr geschwächt.

Dieser zusätzliche Angriff, vor allem der bakteriellen Proteasen des *Pseudomonas aeruginosa* auf das physiologische Gleichgewicht konnte durch den Nachweis des Auftretens von Spalt- und Abbauprodukten der Immunglobuline (Ig G) nachgewiesen werden.

Es läßt sich noch nicht mit Sicherheit sagen, inwieweit diese Spalt- und Abbauprodukte der Immunglobuline die Fähigkeit der Bindung und Neutralisierung von antigenem Material behalten und somit auf das Entzündungsgeschehen einen hemmenden Einfluß nehmen.

G. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) K. Hochgesand, K. Hochstraßer:
"Nachweis von Komplexen zwischen Antitrypsin (AT) und Proteasen bei Erkrankungen im HNO-Bereich."
Archiv klin. exp. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk. Bd. 205
Heft 1 (1973)
- (2) Moskowitz, W. und Heinrich, G.:
in Pulmonary Emphysema and Proteolysis (Mittman, Ch., Hrsg.)
S. 261 - 268 Academic Press, New York and London (1972)
- (3) K. Hochstraßer, H. M. Theopold und O. Brandl:
"Zur Hemmbarkeit der Proteasen aus *Pseudomonas aeruginosa*
durch α_2 -Makroglobulin."
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354 S. 1015 (1973)
- (4) K. Hochstraßer, H. Haendle, R. Reichert und E. Werle:
"Über Vorkommen und Eigenschaften eines Proteaseninhibitors
im menschlichen Nasensekret."
Z. Physiol. Chem. Bd. 352 S. 954 - 958 (1971)
- (5) K. Hochstraßer, R. Reichert, M. Matzner und E. Werle:
"Hemmbarkeit proteolyt. Enzyme in pathol. Nasensekreten und
von Leukozytenproteasen durch den natürlichen Proteaseninhi-
bitor im Nasensekret."
Z. Klin. Chem. und Klin. Biochem. 10 S. 104 - 107 (1972)
- (6) E. Müller und E. H. Graul:
Diagnostik 5: S. 148 - 151 (1972)
- (7) R. R. Porter:
"The strukture of Antibodies."
Sci. Amer. 217 (1967) 81.
- (8) J. H. Humphrey und R. G. White:
"Kurzes Lehrbuch der Immunologie"
Dt. Übers. 2. Aufl. S. 91
Georg Thieme Verlag/Stuttgart (1972)

- (9) M. D. Poulik:
Nature (London) 210, 133 (1966)
- (10) R. R. Porter (Organizer):
"A discussion on the chemistry and biology of immunoglobulins."
The Royal Society (London) Proceedings, B. 166, 114 - 243
(1966)
- (11) J. H. Humphrey und R. G. White:
"Kurzes Lehrbuch der Immunologie (1972)."
S. 99, Kap. Immunglobuline. Schemat. Struktur nach R. R. Porter
- (12) E. A. Kabat:
"Kabat and Mayer's experimental immunochemistry."
2 d ed. Springfield (Ill.)
Charles C. Thomas Publ. Kap. 7 (1961)
- (13) J. H. Humphrey und R. G. White:
"Kurzes Lehrbuch der Immunologie (1972)."
S. 111, Kap. Immunglobuline
Schemazeichnung
- (14) K. Hochgesand, E. Kastenbauer und K. Hochstraßer:
"Proteaseninhibitoren und proteolytische Aktivität im Sekret
von akuten und chronischen Mittelohrentzündungen."
Archiv klin. exp. Ohr-, Nasen- und Kehlkopfheilk. Bd. 207,
466, 2. Teil (1974)
- (15) H. Beckmann, K. Terrahe und M. Essing:
"Nachweis und quantitative Bestimmung der verschiedenen Anti-
körper im Sekret chron. entzündeter Ohren."
Archiv klin. und exp. Ohren-, Nasen- und Kehlkopfheilk. Bd.
205, 164 (1973)
- (16) K. Hochstraßer, H. M. Theopold und O. Brandl:
"Zur Hemmbarkeit der Proteasen aus Pseudomonas aeruginosa
durch α_2 -Makroglobulin."
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354 S. 1013 (1973)

- (17) K. Movihara:
"Production of Elastase and Proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*."
J. Bakteriolog. 88, 745 - 757 (1964)
- (18) G. G. Johnson, J. M. Morris and R. S. Berk:
"The extracellular Protease from *Pseudomonas aeruginosa* exhibiting elastase activity."
Can. J. Microbiol. 13, S. 711 - 719 (1966)
- (19) G. Meinke, R. S. Berk:
"In vivo Studies with a Toxic Fraction of *Pseudomonas aeruginosa*."
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135 S. 360 - 363 (1970)
- (20) R. Reichert, K. Hochstraßer und W. Elgas:
"Nachweis eines niedermolekularen Proteaseninhibitors in Schleimhäuten der Atemwege."
Msschr. Ohr. h. K., Wien 107, 7, S. 333 (1973)
- (21) Z. Muszynski:
Path. Microbiol. 39, S. 135 - 147 (1973)
- (22) Ö. Ouchterlony:
Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 26 B, 1 (1948)
- (23) L. Michaelis:
Biochem. Z. 234, 139 (1931)
- (24) H. G. Schwick, K. Störiko und W. Becker:
"Qualitative Plasma-Proteinbestimmung durch Immunpräzipitation."
Laborat. Blätter f. die med. Diagnostik Nr. 3, Behringwerke AG (1971)
- (25) P. Grabar, C. A. Williams:
Biochem. biophysica Acta (Amsterdam) 10, 193 (1953)
- (26) J. J. Scheidegger:
Int. Arch. Allergy 7, 103 (1955)

- (27) G. Mancini, A. O. Carbonara and J. F. Heremans:
Immunochemistry 2, 235 (1965)
- (28) W. Becker, W. Rapp, H. G. Schwick und K. Störiko:
"Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen
durch Immunpräzipitation."
Z. für Klin. Chem. und Klin. Biochem. Heft 3, S. 3 - 6 Son-
derdruck
- (29) dto. S. 7, Sonderdruck
- (30) Behringwerke AG:
Tri-Partigen^(R)-Immundiffusionsplatten für die quantitative
Bestimmung der Immunglobuline Ig G, Ig A und Ig M.
Anleitung für Tri-Partigen^(R)-Platten
- (31) dto. Analysenverfahren B.
- (32) Behringwerke AG:
"Internationale Standardisierung quantitativer Immunglobulin-
Bestimmungen."
1t. Nov. 1972/RA. 830
- (33) W. Becker, K. Störiko:
"Immunological Determination of Immunoglobulins: Normal
Values and Preparation of a Standard."
vol. 4, pp. 129 (Karger, Basel, München, New York (1970))
- (34) D. S. Rowe, S. G. Anderson and B. Grab:
"A research Standard for Human Serum Immunoglobulins Ig G,
Ig A and Ig M."
Bull. Wld. Hlth. Org. 42, 535 (1970)
- (35) S. G. Anderson et al.:
"Measurements of concentrations of human serum immunoglobu-
lins."
Eur. J. Immunol. 1, 224 (1971)
- (36) Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala/Schweden:
"Gelfiltration mit Sephadex^(R)-G 200."
Arbeitsanleitung der Firma.

- (37) Bergmeyer, H. V.:
"Methoden der enzymatischen Analyse."
2. Aufl. Bd. I, S. 1029
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

LEBENS LAUF

Am 5. Januar 1947 wurde ich als drittes Kind des Chemikers Dr. Franz Tappermann und seiner Ehefrau Cäcilie, geb. Löffler, in Burgkirchen a. d. Alz geboren.

Nach dem Tod meines Vaters 1951 übersiedelten wir nach Burghausen a. d. Salzach, wo ich von 1953 bis 1957 die evangelische Volksschule besuchte und 1968 die Reifeprüfung am humanistischen Kurfürst Maximilian Gymnasium ablegte.

Im Oktober 1968 wurde ich zur Ableistung der Wehrpflicht zur Bundeswehr-Luftwaffe einberufen. Im Februar 1969 verpflichtete ich mich, als Zeitsoldat für insgesamt zwei Jahre bei der Bundeswehr zu bleiben. In dieser Zeit fand meine Ausbildung zum Reserveoffizier der Luftwaffe statt. Im September 1970 wurde ich als Fähnrich entlassen, kurz darauf zum Leutnant d. R. ernannt.

Im Herbst 1970 begann ich mein Studium an der Universität München im Fach Allgemeine Naturwissenschaften. Im Sommer 1971 konnte ich mich in mein beabsichtigtes Studienfach Zahnmedizin einschreiben.

Die naturwissenschaftliche, zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im März 1972.

Die zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im Oktober 1973.

Die zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) bestand ich im Juli 1976.

